

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. Januar 2001 (04.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/00241 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 47/48 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05371
- (22) Internationales Anmeldedatum:
10. Juni 2000 (10.06.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
199 29 104.7 24. Juni 1999 (24.06.1999) DE
- (71) Anmelder: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, 65929 Frankfurt (DE).
- (72) Erfinder: SEDLACEK, Hans-Harald; Sonnenhang 3, 35041 Marburg (DE). BRÜSELBACH, Sabine; An der Haustatt 38, 35041 Marburg (DE). KISSEL, Thomas; Deutschhausstrasse 8a, 35037 Marburg (DE). MÜLLER, Rolf; An der Haustatt 38, 35037 Marburg (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: NOVEL VECTOR COMPLEXES AND THEIR USE IN GENE THERAPY

(54) Bezeichnung: NEUE VEKTORKOMPLEXE UND DEREN VERWENDUNG FÜR DIE GENTHERAPIE

(57) Abstract: The invention relates to a vector complex, containing the following components: a) a nucleic acid sequence of any length; b) a cationic carrier; c) a polymer which has more than 3 cationic charges and more than 3 anionic charges; and d) optionally a ligand which bonds with component a) or component b) or component c) and has at the same time a binding site for a target cell. The invention also relates to the production of said vector complex and the use thereof in the prophylaxis and treatment of diseases.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung bezieht sich auf einen Vektorkomplex, enthaltend folgende Komponenten: a) eine Nukleinsäuresequenz beliebiger Länge; b) einen kationischen Träger; c) ein Polymer, welches mehr als 3 kationische und mehr als 3 anionische Ladungen besitzt; und d) optional einen Liganden, welcher an die Komponente a) oder die Komponente b) oder die Komponente c) bindet und zugleich eine Bindungsstelle für eine Zielzelle hat; seine Herstellung und Verwendung zur Prophylaxe und Therapie von Erkrankungen.

WO 01/00241 A2

Neue Vektorkomplexe und deren Verwendung für die Gentherapie

Einführung

- 5 Die wesentlichen Komponenten von Vektoren für die Gentherapie sind bislang Nukleinsäuresequenzen, welche mit einem nichtviralen Träger (z.B. kationische Lipide oder kationische Polymere) komplexiert oder in ein Virus eingefügt werden.

- Die bisherige Erfahrung mit solchen Vektoren bei der Gentherapie
- 10 unterschiedlichster Erkrankungen, insbesondere jedoch von Tumorerkrankungen, zeigt, daß nach Verabreichung eines gentherapeutischen Vektors in den Kreislauf eines Organismus dieser Vektor in kurzer Zeit aus dem Kreislauf eliminiert wird und für die Bindung an die Zielzellen und zur Transfektion dieser Zielzellen nicht mehr zur Verfügung steht (Ogris et al. Gene Ther. 6: 595, 1999; Dash et al., Gene
- 15 Ther. 6: 643, 1999; Li et al., Gene Ther. 5: 930, 1998; Liu et al. Gene Ther. 4: 517, 1997).

- Diese Elimination kann erfolgen durch Degradation der DNA oder durch schnelle Ablagerung der Vektoren in der Lunge, der Leber oder dem sogenannten
- 20 retikuloendothelialen System (RES), welches besonders ausgebildet ist in der Milz und den Lymphknoten (Zhu et al., Science 261: 209, 1993).

- Die Ursachen der schnellen Elimination sind vielgestaltig. Sie können sein eine zu große negative oder positive Ladung, ein zu großes Volumen oder eine Opsonierung
- 25 der Vektorpartikel durch Blutproteine. Bei viralen Vektoren können sie des weiteren sein die Bindung der Virushüllproteine an virusspezifische Rezeptoren in den Organen und/oder auch Antikörper oder Immunzellen spezifisch für die Viren, welche an die Vektoren binden und diese hierdurch eliminieren.

- 30 Die bisherige Erfahrung zeigt des weiteren, daß die Kopplung oder Einfügung eines zielzellspezifischen Liganden in den Vektorkomplex dessen schnelle Elimination nach Verabreichung in den Blutkreislauf nicht wesentlich vermindert.

In Kenntnis dieser Probleme besteht die dringliche Notwendigkeit nach neuen Zubereitungen von Vektoren, die es ermöglichen, daß Vektoren möglichst lang im Kreislauf verbleiben und nicht vorzeitig aus dem Kreislauf eliminiert werden. Um die Elimination von kationischen Lipiden oder kationischen Polymeren im Komplex mit Nukleinsäuresequenzen aus dem Blutkreislauf zu vermindern, wurde

5 Polyethylenglykol (Senior et al., Biochim. Biophys. Res. Acta 1062: 77, 1991; Mori et al., FEBS Lett 284: 263, 1991; Ogris et al., Gene Ther. 6: 595, 1999), Vinylpolymere (Torchilin et al., Biochim. Biophys. Res. Acta 1195: 181, 1994) oder andere amphipatische Polymere (Woodle et al., Bioconjugat. Chem. 5: 493, 1994) an die

10 kationischen Lipide oder kationischen Polymere gekoppelt oder mit Hilfe negativ geladener Lipide anionische Liposomen hergestellt, in welche die Nukleinsäuresequenzen im Komplex mit kationischen Lipiden oder kationischen Polymeren eingeschlossen waren (US Patent Nr. 4,946,787; US Patent Nr. 4,245,737; US Patent Nr. 5,480,463; Heywood und Eanes, Calc. Tissue Int. 40: 149,

15 1992; Lee und Huang, J. Biol. Chem. 271: 8481, 1996; Balicki und Beutler, Blood 88: 3884, 1996; Lucie et al., J. Lip. Res. 8: 57, 1998; Lakkaraju et al., J. Lip. Res. 8: 74, 1998; Turner et al., J. Lip. Res. 8: 114, 1998; Schoen et al., J. Lip. Res. 8: 485, 1998).

20 Derartige Modifikationen führten beispielsweise zu einer Stabilisierung der Vektorpartikelgröße, inhibierten die Aggregation der Vektoren mit sich selbst oder mit Blutzellen, reduzierten die Opsonierung von Vektoren durch Bindung von Immunglobulinen, Complementfaktoren, Fibrinogen oder Fibronectin, schützten (adeno-)virale Vektoren vor der Elimination durch Antikörper (Chillon et al., Gene

25 Ther. 5: 995, 1998) und bewirkten eine Verlängerung der Blutverweilzeit von Vektoren, eine deutlich stärkere Anreicherung in subkutan wachsende Tumoren und eine Transduktion der Tumorzellen (Ogris et al., Gene Ther. 6: 595, 1999).

Zugleich konnte jedoch auch in der Lunge, der Milz und der Leber eine beträchtliche

30 Anreicherung der Vektoren und Transduktion der Gewebezellen in diesen Organen festgestellt werden (Ogris et al., Gene Ther. 6: 595, 1999), so daß gefolgert werden kann, daß beispielsweise die Kopplung von PEG zwar eine Verbesserung, aber noch keine Optimierung der Verteilung von Vektoren bewirkt.

Allgemeine Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein neuer Vektor für die Gentherapie bestehend aus folgenden Komponenten:

5

- a) einer Nukleinsäuresequenz beliebiger Länge, ggfs. als Teil eines Virus;
- b) einem kationischen Träger; und
- c) einem Polymer, welches mehr als 3 kationische und mehr als 3 anionische Ladungen besitzt.

10

Komponente a) kann eine nicht-modifizierte oder modifizierte DNA-Sequenz oder eine nicht-modifizierte oder modifizierte RNA-Sequenz sein. Die Nukleotidsequenz kann eine anti-DNA (Triplex) oder anti-RNA (antisense; Ribozym) Funktion ausüben oder für eine derartig wirkende RNA-Sequenz oder für ein Protein kodieren. Die

15

Nukleotidsequenzen und ihre Modifikation kann dergestalt sein, daß die Nukleotidsequenz weitgehend resistent ist gegen den Abbau durch DNAsen oder RNAsen. Beispiele für derartige Nukleotidsequenzen und ihre Modifikationen sind in Breaker, Nature Biotechnol. 15: 427, 1997; Gerwik, Critical Reviews in Oncogenesis 8: 93, 1997; Mukhopadhyay et al., Crit. Rev. Oncogen. 7: 151, 1996; Mercola et al.,

20

Cancer Gene Ther. 2: 47, 1995; Frank-Kamenetski, Annu. Rev. Biochem. 64: 65, 1995 und Fraser et al., Exp. Opin. Invest. Drugs 4: 637, 1995 dargestellt. Die DNA-Sequenz kann linear oder zirkulär, beispielsweise in Form eines Plasmids vorliegen.

Komponente a) kann des weiteren ein Virus darstellen, bevorzugt ein Virus, in

25

welches mit den dem Fachmann bekannten Methoden eine für das Virus fremde Nukleinsäuresequenz eingefügt wurde. Beispiele für derartige Viren sind RTV, AV, AAV, HSV, Vaccinia Viren, Influenzaviren. Derartige und weitere Beispiele sind von Vile, Nature Biotechnol. 15: 840, 1997; McKeon et al., Human Gene Ther. 7: 1615, 1996; Flotte et al., Gene Ther. 2: 357, 1995; Jolly, Cancer Gene Ther. 1: 51, 1994;

30

Dubensky et al., J. Virol. 70: 508, 1996 beschrieben worden.

Komponente b) stellt einen beliebigen kationischen Träger dar. Derartige kationische Träger sind beispielsweise

- kationische Lipide, beispielsweise beschrieben von Kao et al., Oncology Reports 5: 625, 1998, Liu et al., J. Biol. Chem. 270: 24864, 1995; Felgner, Human Gene Ther. 7: 1791, 1996; Ledley, Human Gene Ther. 6: 1129, 1995; Goyal et al., J. Liposom. Res. 5: 49, 1995; Thierry et al., Gene Ther. 4: 226, 1997; Schofield et al., Br. Med. Bull. 51: 56, 1995; Behr, Bioconj. Chem. 5: 382, 1994; Cotten et al., Curr. Opin Biotechnol. 4: 705, 1993; San et al., Human Gene Ther. 4: 781, 1993 oder
- kationische Polymere, beispielsweise beschrieben von Boussif et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7297, 1995; Kaneda et al., Science 243: 375, 1989; Keown et al., Methods in Enzymology 185: 527, 1990; Baker et al., Gene Ther. 4: 773, 1997; Fritz et al., Human Gene Ther. 7: 1395, 1996; Wolfert et al., Human Gene Ther. 7: 2123, 1996 und Solodin et al., Biochem. 34: 13537, 1995.

Zu den kationischen Polymeren gehört beispielsweise auch kationisiertes

Albumin. Herstellung und Verwendung von kationisiertem Albumin wurde in der Patentanmeldung EP-A 0 790 312 beschrieben.

In einer besonderen Ausführungsform dieser Erfindung stellt die Komponente b) ein Polyethylenimin (PEI) dar, in einer weiteren besonderen Ausführungsform dieser Erfindung besitzt das Polyethylenimin ein Molekulargewicht in einem Bereich von 500-20.000 Da und in einer weiteren Ausführungsform ein Molekulargewicht von durchschnittlich etwa 2000 Da und wurde hergestellt, wie in der Patentanmeldung EP-A 0 905 254 beschrieben.

Komponente c) stellt ein beliebiges Polymer mit mehr als 3 kationischen und mehr als 3 anionischen Ladungen dar. Im Gegensatz zum Stand der Technik (US Patent Nr. 3,155,474) soll das Verhältnis von kationischen zu anionischen Ladungen nur in dem Bereich zwischen 3:10 und 10:3 schwanken. Vorzugsweise ist das Verhältnis 1 ($\pm 20\%$):1 ($\pm 20\%$) zu verwenden. Die Ladungen können ungleichmäßig, zufällig oder auch gleichmäßig über das Polymer verteilt sein. Bevorzugt im Sinne der Erfindung werden Polymere mit einer gleichmäßigen Verteilung der kationischen und anionischen Ladung. Bevorzugt im Sinne der Erfindung sind des weiteren Polymere mit kationischer und anionischer Ladung, deren isoelektrischer Punkt im pH Bereich

von 3-9 liegt. Des weiteren bevorzugt im Sinne der Erfindung sind Polymere mit kationischer und anionischer Ladung, deren isoelektrischer Punkt im pH Bereich von 3-7 liegt. In einer besonderen Ausführungsform stellt das erfindungsgemäße

Polymer Albumin dar. Dieses Albumin kann aus dem Blut isoliert oder rekombinant

5 hergestellt sein. In einer weiteren besonderen Ausführungsform ist das Albumin gereinigtes Humanalbumin aus dem Serum. Die Reinigung und die Eigenschaften von Albumin sind beispielsweise bei T. Peters in F.W. Putnam "The Plasma Proteins", Academic Press, New York 1975, S. 133-181, beschrieben worden.

Humanes Serumalbumin stellt eine einzelkettige Polypeptidkette (610 Aminosäuren)

10 dar mit einem isoelektrischen Punkt von 4.7 und etwa 101 positiven und 101 negativen Ladungen, welche gleichmäßig über die gesamte Polypeptidkette verteilt sind.

Entsprechend dieser Erfindung wird die Komponente a) mit der Komponente b)

15 komplexiert und dieser Komplex wiederum mit der Komponente c) komplexiert. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist, die Komplexe aus Komponente a) und b)

in Liposomen, vorzugsweise anionische Liposomen [hergestellt beispielsweise wie im US Patent Nr. 4,946,787, US Patent Nr. 4,245,737, US Patent Nr. 5,480,463, Heywood und Eanes, Calc. Tissue Int. 40: 149, 1992; Lee und Huang, J. Biol. Chem.

20 271: 8481, 1996; Balicki und Beutler, Blood 88: 3884, 1996; Lucie et al., J. Lip. Res. 8: 57, 1998; Lakkaraju et al., J. Lip. Res. 8: 74, 1998; Turner et al., J. Lip. Res. 8: 114, 1998; Schoen et al., J. Lip. Res. 8: 485, 1998 beschrieben, mit der dem

Fachmann bekannten Methodik [beispielsweise beschrieben von Li und Huang, J. Lip. Res. 7, 63 (1997) oder US Patent Nr. 4,946,787] einzufügen und diese

25 Liposomen mit der Komponente c) zu komplexieren.

Gegenstand der Erfindung ist des weiteren die Ergänzung der erfindungsgemäßen Zubereitung von Vektoren durch Hinzufügung einer Komponente d).

30 Diese Komponente d) stellt einen Liganden dar, welcher mit der Komponente a) oder der Komponente b) oder der Komponente c) bindet und zugleich eine Bindungsstelle für die Zielzelle hat.

Derartige Liganden können sein

- mehrfach funktionelle Ligandensysteme zur zielzellspezifischen Übertragung von Nukleotidsequenzen, beschrieben in EP-A 0 846 772
- 5 - einzelkettige, zweifach-antigenbindende Moleküle beschrieben in DE198161417, noch unveröffentlicht
- spezifisch Zellmembran-penetrierende Moleküle beschrieben in DE19850987.1, noch unveröffentlicht oder
- zielzellspezifische, multivalente Proteine beschrieben in DE19910419.0, noch
10 unveröffentlicht

Auf die hier aufgeführten Patentanmeldungen wird ausdrücklich Bezug genommen.

- Die Komponente d) kann jedoch auch in ein Liposom, vorzugsweise ein anionisches
15 Liposom, eingefügt werden, beispielsweise wie in den US Patenten Nr. 5,252,348 und 5,753,258 beschrieben.

- Hierzu ist das zielzellspezifische Protein oder Peptid, ausgewählt aus einer der
zuvor erwähnten Gruppen, an ein Lipid zu konjugieren, beispielsweise wie im US
20 Patent Nr. 5,662,930 beschrieben. In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist das zielzellspezifische Protein oder Peptid mit einem fusiogenen Peptid verbunden und dieses wiederum mit einem Lipid. Beispiel für fusiogene Peptide sind in den Patentanmeldungen EP-A 0 846 772 und DE19850987.1 (noch
unveröffentlicht) ausführlich beschrieben. Die Konjugation des zielzellspezifischen
25 Proteins oder Peptids mit einem fusiogenen Peptid erfolgt vorzugsweise durch die Expression als rekombinantes Fusionsprotein mit den dem Fachmann bekannten Methoden.

- Die Herstellung des erfindungsgemäßen Vektors bestehend aus den Komponenten
30 a), b) und c) oder a), b), c) und d) erfolgt beispielsweise derartig, daß

- im 1. Schritt Komponente d) mit Komponente a), b) und/oder c) im molaren Verhältnis [d):a), b) und/oder c)] von 1:1 bis 1000:1, vorzugsweise zwischen 10:1 und 100:1 vermischt wird, nachfolgend

- 5 - im 2. Schritt Komponente a) [entweder alleine oder im Komplex mit Komponente d)] mit Komponente b) [im Komplex mit Komponente d) oder alleine] vermischt wird und zwar bevorzugterweise im molaren Verhältnis [a) (\pm d):b) (\pm d)] von 1:1 bis 1:1000, wobei das Mischungsverhältnis so eingestellt werden soll, daß die Nettoladung des resultierenden Gesamtkomplexes vorzugsweise entweder
- 10 kationisch oder anionisch ist und nachfolgend

- im 3. Schritt der aus Schritt 2) resultierende Komplex mit der Komponente c) vermischt wird [im Komplex mit d) oder alleine] und zwar derartig, daß die Komponente c) im Überschuß vorliegt, meßbar daran, daß die Nettoladung des aus Schritt 2) resultierenden Komplexes durch Schritt 3) komplett neutralisiert wurde, vorzugsweise, daß das aus Schritt 3) resultierende Gemisch aus freiem Albumin und Albumin-haltigen Komplexen eine leicht anionische bis neutrale Nettoladung aufweist, des weiteren vorzugsweise der albuminhaltige Komplex seinen isoelektrischen Punkt im pH-Wertbereich von 4-7 aufweist.

20

Derartige erfindungsgemäße Vektorkomplexe sind durch ihre Komponente c) weitgehend abgeschirmt, d.h. ihre Bindung und Transfektion und Transduktion von Zellen, die keinen Rezeptor für die Komponente d) innerhalb des erfindungsgemäßen Vektorkomplexes tragen, ist weitgehend vermindert.

25

Infolgedessen ist nach Verabreichung der erfindungsgemäßen Vektorkomplexe in einen Organismus, entweder lokal, auf die Haut, in ein Organ, eine Körperhöhle, in ein Binde- oder Stützgewebe oder in den Blutkreislauf, die Verweilzeit deutlich verlängert, nach Verabreichung in den Blutkreislauf beispielsweise bis auf mehrere

30 Stunden bis zu einigen Tagen.

Über diese lange Verweilzeit hinweg reichern sich die erfindungsgemäßen Vektorkomplexe beispielsweise im Tumorgefäßbett an aufgrund des sogenannten

"passiven Targetings" (Unezaki et al., Int. J. Pharmaceutics 114: 11, 1996; Sadzuka et al., Cancer Lett. 127: 99, 1998 und Wunder et al., Int. J. Oncol. 11: 497, 1997).

Des weiteren und auch unabhängig vom passiven Targeting binden die
5 erfindungsgemäßen Vektorkomplexe über ihre Komponente d) an die Zielzelle und transfizieren diese zur Freisetzung der Nukleinsäuresequenz im erfindungsgemäßen Vektorkomplex.

Diese Nukleinsäuresequenz kann, je nach Zusammensetzung, in der Zielzelle ihre
10 Wirkung entfalten, d.h. beispielsweise die Transkription oder Translation eines bestimmten Genes oder einer bestimmten RNA hemmen, oder die Zelle transduzieren zur Expression der RNA oder des Proteins kodiert von dieser Nukleinsäuresequenz.

15 Die erfindungsgemäßen Vektorkomplexe sind somit bevorzugt geeignet für die in vivo Verabreichung mit dem Ziel der Prophylaxe oder Therapie von Erkrankungen.

Beispiele zur Verdeutlichung des Erfindungsgedankens

20 Die folgenden Beispiele erläutern, wie man die vorliegende Erfindung ausführen könnte.

Beispiel 1: Herstellung eines Vektorkomplexes mit einem Plasmid und einem
zielzellspezifischen multivalenten Protein.

25 Herstellung von Komponente a)

Als Komponente a) wurde das Plasmid Expressionssystem "pGL3" von Promega
verwendet, welches folgende Nukleotidsequenzen enthält:

- 30
- SV40 Promoter und Enhancer
(Genbank SV40 zirkuläres Genom; NIDg 965480: Nukleotide 5172-294)
 - der cDNA für Luciferase

- SV40-Poly A-Signal

Mit den dem Fachmann bekannten Methoden wurde das Plasmid in E. coli Bakterien
5 eingeführt, die Bakterien in Kulturmedium vermehrt und die Plasmide isoliert.
Herstellung von Komponente b)

Niedrigmolekulares Polyethylenimin (PEI-2000) wurde hergestellt wie in der
Patentanmeldung EP-A 0 905 254 beschrieben. Hierzu wurde eine 10%ige
10 Ethyleniminmonomer-Lösung in Wasser (5 ml Ethyleniminmonomer + 45 ml
destilliertes Wasser, Auflösung unter Rühren) unter Zusatz von 1% (0,5 ml)
konzentrierter Salzsäure (37°C) als Katalysator 4 Tage lang bei 50°C gerührt,
einrotiert und unter Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet. Die
Molekulargewichtsbestimmungen wurden mittels Laserstreulichtmessung
15 (Lichtstreuphotometer Wyatt Dwan DSP) bei 633 nm nach Direktinjektion in eine K5-
Meßzelle durchgeführt. Die Molmassen werden aufgrund der in Toluol bestimmten
Kalibrierkonstanten und der bekannten Probeneinwaage bestimmt.

Die Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Lichtstreuanalyse ergab 2000 Da.
20 Vergleichsweise hatte das kommerziell (Fa. Fluka, Neu Ulm) erhaltene PEI ein
Molekulargewicht entsprechend der Lichtstreuanalyse von 791 kDa (HMW-PEI).

Herstellung von Komponente c)

25 Als Polymer wurde Humanalbumin 20% der Fa. Canteon verwendet.

Herstellung von Komponente d)

Als Komponente d) dient ein mehrfach funktioneller Ligand hergestellt wie in der
30 Patentanmeldung EP-A 0 846 772 beschrieben.

1) Herstellung des zellspezifischen Liganden (ZS)

Als Ausgangsmaterial für den ZS-Liganden dient das Hybridom des anti-NCAM monoklonalen Antikörpers 575/100/2 (Behringwerke). Etwa 10^7 Zellen dieses Hybridoms werden abzentrifugiert und die mRNA wird aus diesen Zellen unter Zuhilfenahme eines mRNA-Extraktionskits (z.B. der Firmen Pharmacia, Gibco, Qiagen) extrahiert. Diese mRNA wird dann durch reverse Transkription unter Zuhilfenahme eines cDNA-Synthese-Kits und "random" Hexaoligonukleotiden (Pharmacia) in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA dient als Ausgangsmaterial um mit Hilfe von spezifischen Primern (Clackson et al., Nature 352: 624, 1991) die variable schwere Kette bzw. die variable leichte Kette der Immunglobuline mittels Polymerasekettenreaktion (Saiki et al., Science 230: 1350, 1985) zu amplifizieren. Durch die Primer werden gleichzeitig Restriktionsschnittstellen eingeführt, um die Fragmente in einen bakteriellen Expressionsvektor (z.B. pHENIS, der sich von pHEN1 ableitet) (Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res. 19: 4133, 1991) zu klonieren. Er enthält eine pelB-Signalsequenz für die periplasmatische Sekretion, ein Histidintag für die Reinigung mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC) sowie eine Klonierungsregion für die schwere und leichte Kette zwischen einer kurzen Sequenz, die für einen 14 Aminosäure-langen Glycin-Serin-Linker codiert. Ferner erfolgt die Fusion mit dem g3p-Protein für das "display" an der Oberfläche von Bakteriophagen. Die schwere und leichte Kette werden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (VH mit SfiI und XhoI; VL mit ApaI und NotI) verdaut und nacheinander in den Vektor kloniert. Dadurch entsteht ein rekombinantes einzelkettiges Fv-Fragment bestehend aus der variablen schweren Kette und leichten Kette, die durch eine kurze Peptidsequenz kovalent verbunden sind.

2) Herstellung des genkonstruktsspezifischen Liganden (GS)

Rekombinante Antikörper mit Spezifität für N6-Methyladenin werden aus nativen bzw. semi-synthetischen Antikörperbibliotheken (Nissim et al., EMBO J. 13: 692, 1994) durch Biopanning an N6-Methyladenin-BSA bzw. -KLH-Konjugaten selektioniert. Die

Identifizierung positiver Antikörperfragmente erfolgt durch ELISA in antigengecoateten Mikrotiterplatten (Nissim et al., EMBO J. 13: 692, 1994). Antikörper aus diesen Bibliotheken sind bereits in dem gewünschten einzelkettigen Fv-Format und können direkt für weitere Klonierungen eingesetzt werden.

5

3) Herstellung des Linkers

Als Linker dient ein fusiogenes Peptid mit der Aminosäuresequenz GLFEALLELLESLWELLLEA (SEQ ID NO.: 1). Die codierende DNA für dieses Peptid wird als doppelsträngiges, synthetisches Oligonukleotid hergestellt, wobei an den Enden geeignete Restriktionsschnittstellen (Ascl und Xbal) angehängt werden. Dafür werden die zwei synthetischen Oligonukleotide

10

O1(5'GGCCGCAGGCTTATTTGAGGCCCTTCTGGAATTGCTAGAGAGCCTCTGGG AATTGCTTCTGGAGGCAT; SEQ ID NO.: 2) und

15

O2(5'CTAGATGCCTCCAGAAGCAATCCCAGAGGCCTCTAGCAATTCCAGAAGGG CCTCAAATAAGCCTG; SEQ ID NO.: 3) mit T4 Polynukleotidkinase (z.B. Gibco) entsprechend den Angaben des Herstellers phosphoryliert, für 5 min auf 80°C erwärmt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Dieses doppelsträngige DNA-Fragment wird direkt für weitere Klonierungen verwendet.

20

4) Herstellung des Fusionsproteins

Das komplette Ligandensystem wird in den Expressionsvektor pAB1 (der ähnlich wie pHENIS aufgebaut ist, jedoch keine Fusion mit g3p aufweist) z.B. in Form einer 3-

25

Fragment-Klonierung hergestellt. Als Ausgangsmaterial dienen das anti-NCAM einzelkettige Fv-Fragment (ZS-Ligand), das mit den Restriktionsenzymen SfiI und NotI geschnitten wurde, das synthetische Linker-Fragment, das die Klonierungsstellen NotI und XbaI enthält, und das anti-N6-Methyladenin einzelkettige Fv-Fragment (GS-Ligand). Für die Klonierung wird das GS-Fragment mit Primern reamplifiziert, die am N- und C-Terminus die Restriktionsschnittstellen XbaI bzw. Ascl einfügen. Diese Fragmente werden in den mit den Restriktionsenzymen SfiI und Ascl geschnittenen pAB1- Vektor kloniert. Das Konstrukt wird in geeignete Bakterienstämme, z.B. E. coli TG1, transformiert. Die Regulation der Expression des

30

Ligandensystems erfolgt über den bakteriellen lacZ-Promoter und wird durch Zugabe von IPTG induziert (wie z.B. beschrieben in McCafferty et al., Appl. Biochem. Biotech. 47: 157, 1994). Das exprimierte Protein wird aus periplasmatischen Präparationen mittels IMAC aufgereinigt (siehe Griffiths et al., EMBO J. 13: 3245, 1994). Das Gesamtprotein besitzt ein Molekulargewicht von ca. 55.000 und liegt als Monomer vor.

5) Funktionsprüfung des Fusionsproteins

Das Protein erkennt NCAM-exprimierende Tumorzellen wie z.B. die des kleinzelligen Bronchialkarzinoms und es bindet an N6-methylierte DNA, die durch Propagation der Plasmide in Bakterien hergestellt wird. Das Ligandensystem wird durch Inkubation des Fusionsproteins mit der DNA hergestellt. Die Bindung an die Tumorzelle bzw. DNA kann mittels Immunofluoreszenz bzw. ELISA überprüft werden. Durch Bindung des Fusionsproteins an Plasmid-DNA, die ein Reportergen enthält [z.B. Luciferase (siehe Komponente a)], entsteht ein Ligandensystem, das in der Lage ist, an die Tumorzellen zu binden. Nach Aufnahme der Komplexe in die Zelle erfolgt die Linker-vermittelte Freisetzung aus den Endosomen was zur Transkription und Expression des Effektorgens führt. Die Bindung des Ligandensystems an die Zelle und Aufnahme in die Zelle läßt sich durch Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Fusionsprotein nachweisen und die Funktionalität des Systems erfolgt durch den Nachweis der enzymatischen Aktivität von Luciferase.

25 Herstellung des Vektorkomplexes

Plasmide [Komponente a)] werden in einer Konzentration von 10^9 Plasmide/ml in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. In die Suspension wird unter Schütteln der multifunktionelle Ligand [Komponente d)] gelöst in physiologischer Kochsalzlösung portionsweise hinzugegeben, bis ein molares Verhältnis von etwa 1:10 (Plasmid: multifunktionaler Ligand) erreicht ist.

Dem Komponente a)/Komponente d)-Komplex oder der Komponente a) wird anschließend [Komponente b)] PEI-2000 (1 mg/ml phys. Kochsalzlösung mit 1 N HCl auf pH 7,4 eingestellt) portionsweise hinzugegeben, bis eine vollständige Kationisierung der entstehenden Komplexe [Komponente a)+d)+b) bzw.

5 Komponente a)+b)] erreicht ist.

Die Kationisierung wird im Agarose-Shift-Assay bestimmt, bei welchem 50 µl Aliquots auf ein ca. 0,5 cm dickes Gel aus 1% (w/v) Agarose aufgetragen und in Tris-EDTA-Puffer pH 7,4 bei 80 mV 2 h lang entwickelt werden. Die Lokalisation der

10 DNA wurde bei 254 nm nach Reaktion mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Die kationischen Komplexe aus den Komponenten a)+d)+b) werden anschließend in einem Überschuß von Komponente c) suspendiert und für mindestens 48 Stunden bei 4°C inkubiert. In diesem Überschuß bilden sich Komplexe aus den Komponenten

15 a)+d)+b)+c), welche eine neutrale bis leicht anionische Ladung haben. Diese Ladung wird im Agarose-Shift-Assay kontrolliert und sollte im Bereich zwischen pH 4 und 7 liegen.

Anschließend ist der erfindungsgemäße Vektorkomplex [Komponente a)+d)+b)+c)]

20 verwendungsfähig. Als Kontrolle gilt der Vektorkomplex Komponente a)+b).

Beispiel 2: Biologische Prüfung des Vektorkomplexes

1) Untersuchungen an Kulturzellen

25 NCAM exprimierende Tumorzellen (kleinzelliges Bronchialkarzinom), Melanomzellen (MeWo) und Fibroblasten (3T3) wurden in der Zellkultur mit der dem Fachmann bekannten Zellkulturtechnik vermehrt und isoliert.

30 Komplexe mit den Komponenten a)+d)+b)+c) oder (zur Kontrolle) mit den Komponenten a)+b) werden im Überschuß (Verhältnis ca. 20:1) zu den Zellen gegeben und das Gemisch bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Nachfolgend werden die

Zellen gewaschen und für weitere 60 Stunden im frischen Zellkulturmedium inkubiert.

- Anschließend wird die erfolgreiche Aufnahme der Komplexe in die Zelle, die Transkription und die Expression des Reportergens im Plasmid durch Nachweis der
- 5 Luciferase mit Hilfe der dem Fachmann bekannten Methode und nach Angabe der Fa. Promega bestimmt.

Folgende Ergebnisse werden erzielt:

- Etwa 15% der Zellen, welche mit Kontrollkomplexen inkubiert worden sind, zeigen
- 10 eine Expression von Luciferase. In NCAM exprimierenden Tumorzellen ist diese etwa gleich wie in den anderen Zellen.

- Im Gegensatz hierzu zeigen nur NCAM-positive Zellen, welche mit dem erfindungsgemäßen Vektorkomplex [Komponente a)+d)+b)+c)] inkubiert werden,
- 15 eine deutliche Expression von Luciferase. In den Kontrollzellen ist dagegen keine oder nur eine geringfügige Expression festzustellen.

- Die Komponente c) im erfindungsgemäßen Vektorkomplex verhindert somit die nicht ligandenspezifische Transfektion von Zellen.
- 20

2) Untersuchung der Blutverweilzeit in Mäusen

- Mäusen (NMRI) werden in die Schwanzvene die erfindungsgemäßen Komplexe [Komponente a)+d)+b)+c)] oder zur Kontrolle Komplexe mit den Komponenten a)+b) injiziert. Die Dosis ist 50 µg der Komponente a) in den jeweiligen Komplexen pro
- 25 Maus, das Suspensionsmedium physiologische Kochsalzlösung, das Applikationsvolumen 250 µl.

- 30 Minuten und 2 Stunden nach der Injektion werden die Tiere narkotisiert und
- 30 entblutet. Das aufgefangene Blut wird mit Natriumzitrat (Endkonzentration 25 mM) versetzt und das Blutplasma von den Blutzellen durch Zentrifugation (10 min, 1000 g) abgetrennt. Die DNA wird aus dem Vollblut bzw. aus dem Blutplasma mittels des QIAamp Tissue Kits (Qiagen, Hilden) isoliert.

Hierzu werden zu 100 µl von Blut oder Plasma jeweils 10 µl Heparin (1000 IU/ml Novo Nordisk) während der Erstinkubation bei 70% hinzugegeben, um die Plasmid DNA quantitativ zu isolieren. Proben der isolierten DNA wurden auf 0,8% Agarosegel aufgetragen und per Southern Blot analysiert wie im Detail bei Obrist et al. 1999

5 beschrieben.

Ergebnisse

10 Während nach Verabreichung der Kontrollpräparation nach 0,5 Stunden nur noch Spuren von Plasmid DNA im Blutplasma nachweisbar sind, kann im Blutplasma der Tiere verabreicht mit den erfindungsgemäßen Komplexen nach 0,5 und auch noch nach 2 Stunden beträchtliche Mengen an DNA nachgewiesen werden.

15 Diese Ergebnisse zeigen, daß sich die erfindungsgemäßen Vektorkomplexe, wie erwünscht, durch eine bedeutende Verlängerung der Blutverweilzeit auszeichnen.

Patentansprüche:

- 5 1) Vektorkomplex, enthaltend folgende Komponenten:
- a) eine Nukleinsäuresequenz beliebiger Länge;
 - b) einen kationischen Träger;
 - c) ein Polymer, welches mehr als 3 kationische und mehr als 3 anionische
10 Ladungen besitzt; und
 - d) optional einen Liganden, welcher an die Komponente a) oder die
Komponente b) oder die Komponente c) bindet und zugleich eine
Bindungsstelle für eine Zielzelle hat;
- erhältlich durch
- 1. gegebenenfalls Mischung von Komponente d) mit Komponente a), b)
15 und/oder c) im molaren Verhältnis [d):a),b) und/oder c)] von 1:1 bis
1000:1, vorzugsweise zwischen 10:1 und 100:1;
 - 2. Mischung von Komponente a); entweder alleine oder im Komplex mit
Komponente d), mit Komponente b), entweder alleine oder im Komplex
mit Komponente d); bevorzugterweise im molaren Verhältnis $[a) \pm d) : b)$
20 $\pm d)]$ von 1:1 bis 1:1000, wobei das Mischungsverhältnis so eingestellt
werden soll, daß die Nettoladung des resultierenden Gesamtkomplexes
vorzugsweise entweder kationisch oder anionisch ist; und
 - 3. Mischung des aus Schritt 2) resultierenden Komplexes mit der
Komponente c), entweder alleine oder im Komplex mit d), und zwar so,
25 daß die Komponente c) im Überschuß vorliegt, wobei die Nettoladung
des aus Schritt 2) resultierenden Komplexes durch Schritt 3) komplett
neutralisiert wird.
- 2) Vektorkomplex nach Anspruch 1), bei welchem der isoelektrische Punkt des
30 Polymers [Komponente c)] im pH-Bereich von 3-9 liegt.
- 3) Vektorkomplex nach Anspruch 2), bei welchem der isoelektrische Punkt des
Polymers [Komponente c)] im pH-Bereich von 3-7 liegt.

- 4) Vektorkomplex nach Ansprüchen 1-3), bei welchem die Komponente c) Albumin ist.
- 5) Vektorkomplex nach Ansprüchen 1-4), bei welchem die Komponente c) rekombinant hergestelltes humanes Albumin ist.
- 6) Vektorkomplex nach Ansprüchen 1-4), bei welchem die Komponente c) humanes Serumalbumin ist.
- 10 7) Vektorkomplex nach einem der Ansprüche 1-6), bei welchem die Komponente a) eine DNA oder RNA darstellt.
- 8) Vektorkomplex nach einem der Ansprüche 1-6), bei welchem die Komponente a) ein viraler Vektor ist.
- 15 9) Vektorkomplex nach Anspruch 8), bei welchem der virale Vektor ausgewählt wird aus einer Gruppe umfassend RTV, AV, AAV, Vaccinia V., Influenza V, HSV, Lenti V.
- 20 10) Vektorkomplex nach einem der Ansprüche 1-9), bei welchem der kationische Träger ein kationisches Lipid ist.
- 11) Vektorkomplex nach einem der Ansprüche 1-9), bei welchem der kationische Träger ein kationisches Polymer ist.
- 25 12) Vektorkomplex nach Anspruch 11), bei welchem das kationische Polymer Polyethylenimin (PEI) ist.
- 13) Vektorkomplex nach Anspruch 12), bei welchem das Molekulargewicht des PEI in einem Bereich von 500 bis 20.000 Da liegt.
- 30 14) Vektorkomplex nach Anspruch 13), bei welchem das PEI ein Molekulargewicht von durchschnittlich 2000 Da aufweist.

- 15) Vektorkomplex nach Ansprüchen 1-14), bei welchem die Komponenten a) und b) in ein Liposom eingefügt sind und das Liposom mit Komponente c) komplexiert ist.
- 5 16) Vektorkomplex nach Anspruch 15), bei welchem das Liposom eine anionische Ladung aufweist.
- 17) Vektorkomplex nach einem der Ansprüche 1-16), bei welchem die Komponente d) ausgewählt ist aus einer Gruppe umfassend einen multifunktionalen
10 Liganden, ein einzelkettiges, doppelantigenbindendes Protein oder ein komplexbildendes Protein.
- 18) Vektorkomplex nach einem der Ansprüche 1-16), bei welchem die Komponente d) aus einem zielzellspezifischen Liganden und einem Lipid besteht und in ein
15 Liposom eingefügt ist.
- 19) Vektorkomplex nach einem der Ansprüche 1-16), bei welchem die Komponente d) aus einem zielzellspezifischen Liganden, einem fusiogenen oder translozierendem Peptid und einem Lipid besteht und in ein Liposom eingefügt
20 ist.
- 20) Vektorkomplex nach Ansprüchen 17-19), bei welchem die Komponente d) die Bindung an und die Translokation in eine Zielzelle vermittelt.
- 25 21) Vektorkomplex nach Anspruch 20), wobei die Zielzelle eine Gewebezelle, ein Epithelzelle, eine Endothelzelle, eine Blutzelle, eine Leukämiezelle oder eine Tumorzelle ist.
- 22) Vektorkomplex nach einem der Ansprüche 1-20), bei welchem der
30 isoelektrische Punkt des Komplexes im pH-Bereich von 4-7 liegt.
- 23) Verwendung eines Vektorkomplexes nach einem der Ansprüche 1-22) für die Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung.

24) Verwendung des Vektorkomplexes nach Anspruch 23) zur Verabreichung auf die Haut, auf eine Schleimhaut, in eine Körperhöhle, in das Bindegewebe, in ein Organ oder in den Blutkreislauf.

- 5 25) Verfahren zur Herstellung eines Vektorkomplexes, enthaltend folgende Komponenten:
- a) eine Nukleinsäuresequenz beliebiger Länge;
 - b) einen kationischen Träger;
 - c) ein Polymer, welches mehr als 3 kationische und mehr als 3 anionische
10 Ladungen besitzt; und
 - e) optional einen Liganden, welcher an die Komponente a) oder die Komponente b) oder die Komponente c) bindet und zugleich eine Bindungsstelle für eine Zielzelle hat;

wobei folgende Verfahrensschritte durchlaufen werden:

- 15 1. gegebenenfalls Mischung von Komponente d) mit Komponente a), b) und/oder c) im molaren Verhältnis [d):a), b) und/oder c)] von 1:1 bis 1000:1, vorzugsweise zwischen 10:1 und 100:1;
- 2. Mischung von Komponente a), entweder alleine oder im Komplex mit Komponente d), mit Komponente b), entweder alleine oder im Komplex
20 mit Komponente d); bevorzugterweise im molaren Verhältnis [a) \pm d):b) \pm d)] von 1:1 bis 1:1000, wobei das Mischungsverhältnis so eingestellt werden soll, daß die Nettoladung des resultierenden Gesamtkomplexes vorzugsweise entweder kationisch oder anionisch ist; und
- 3. Mischung des aus Schritt 2) resultierenden Komplexes mit der
25 Komponente c), entweder alleine oder im Komplex mit d), und zwar so, daß die Komponente c) im Überschuß vorliegt, wobei die Nettoladung des aus Schritt 2) resultierenden Komplexes durch Schritt 3) komplett neutralisiert wird.